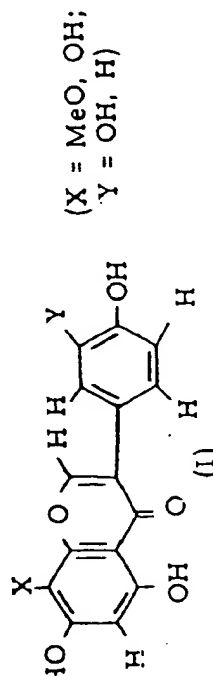


# DERWENT PUBLICATIONS LTD.

27437

<p>27437A/15                  MICROBIOCHEMICAL RE                  19.06.74 JA-069119 (25.12.75) A23k A61k C12d                  Physiologically active iso-flavone prodn. - by aerobically culturing                  Aspergillus on potato starch, glucose, soybean medium</p>	<p>MICR-19.06.74                  *J50160-483</p>	<p>Isoflavones (I)</p>  <p>(X = MeO, OH;                  Y = OH, H)</p> <p>are produced by an aerobic culture of fungi; 3',4',5,7-tetrahydroxy-8-methoxyisoflavone (II), psi-tectorigenin (III, X = OMe, Y = H), and 8-hydroxygenistein (IV, X = OH, Y = H) are produced by Aspergillus.</p> <p><u>USE</u>                  L-Dopa decarboxylase inhibitor.</p> <p><u>EXAMPLE</u>                  A. niger NRRL 3122 was cultured with shaking at 27°C for 5 days on a medium (pH 6.0) contg. potato starch 2 glucose</p>	<p>R(6-A) D(5-C), I</p> <p>1, soybean meal, 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1, and MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%; the pH changed to 5.6, 3.6, 3.2, 5.0 and 6.2 after 1, 2, 3, 4, and 5 days of the cultivation. The culture filtrate (9 l.) was extd 3 times with 4.5 l. BuOAc at pH 2.0. The cells (1.2 kg) are also extd. with 5 l. MeOH and concd. to dryness. The active substances were extd. with 1 l. water (pH 8.0) and then with 0.5 l. BuOAc 3 times at pH 2.0 and combined with the above extract of the culture filtrate. The combined extract was concd. to dryness yielding 12.3 g tar substance. It was subjected to silica gel chromatography eluting with CHCl<sub>3</sub>-Me MeOH (50:1) to separate (III), genistein (V), (II), orobole (VI) and (IV). Each fraction was dried, subjected to "Sephadex LH-20" (RTM) silica gel chromatography and crystd. from MeOH-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>. Yields were 15.8, 4.8, 80.3, 0.1, and 4 mg for (II), (III), (V), (VI) and (IV). They were sol. in alkaline water, MeOH, EtOH, BuOH, Me<sub>2</sub>CO, DMSO and hardly sol. in C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, CHCl<sub>3</sub> and toluene. ID<sub>50</sub> against β-3,4-dihydroxy-phenyl-L-alanine decarboxylase were 0.2, 51.0, and 2.6 μg/ml for (II), (III) and (IV). (14pp-).</p>
	<p>27437A</p>		<p>77</p>
			<p>J50160483</p>



第 2 号

昭和 49 年 6 月 19 日

特 許 願

特 許 庁 長 官 殿

1. 発明の名称 生理活性を有するイソフラボン化合物の微生物による製造法
2. 特許請求の範囲に記載された発明の数・・・4

3. 発 明 者

注 冊 東京都港区麻布台4丁目23番地

氏 名 梅 沢 英 夫 外2名

4. 特許出願人

住 所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号

名 称 財団法人微生物化学研究会

代 表 者 市 川 隆 二

5. 代 理 人

住 所 〒105 東京都港区西新橋1丁目2番9号

三井物産館内 電話(551)0261

(2400) 氏 名

金 丸 義 男

19 969119

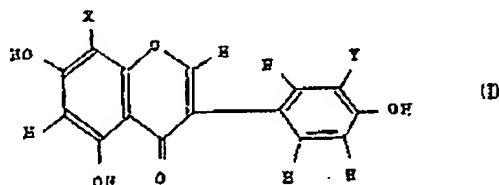
明 細 書

1. 発明の名称

生理活性を有するイソフラボン化合物の微生物による製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 米状菌に属する次の一般式



(式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である)のイソフラボン化合物の生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することを特徴とする、微生物による上記一般式(1)のイソフラボン化合物の製造法。

⑬ 日本国特許庁

## 公開特許公報

⑪特開昭 50-160483

⑬公開日 昭50.(1975) 12.25

⑫特願昭 49-69119

⑭出願日 昭49.(1974) 6.19

審査請求 未請求 (全14頁)

庁内整理番号

7110 49

6617 44

7169 44

⑮日本分類

36(2)D521

30 A32

16 E41

⑯Int. Cl<sup>2</sup>

C12D 13/00

A61K 37/64

A61K 31/35

A23K 1/16

(2) アスベルギルス菌に属する3',4',5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、3',4',5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボンの製造法。

(3) アスベルギルス菌に属するフサイ・テクトリゲニン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、フサイ・テクトリゲニンの製造法。

(4) アスベルギルス菌に属する8-ヒドロキシグニステイン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、8-ヒドロキシグニステインの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は微生物を用いる生産法によりドーパミン様物質に対して阻害作用をもつ新規物質3',4',5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン、あるいは公知物質4',5,7-トリヒドロキ

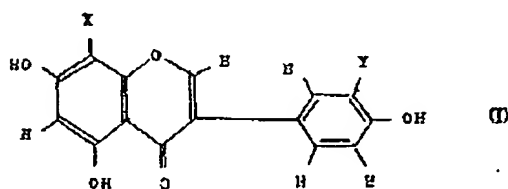
シ-8-メトキシイソフラボン(すなわちプサイ・テクトリゲニン(pai-tectorigenin))又は4',6,7,8-テトラヒドロキシイソフラボン(すなわち8-ヒドロキシグեսティン(8-hydroxyg-  
onistein))を製造する方法に関する。

本発明者等は人の高血圧性及びパー・キンソン氏病のドーパでの治療における経済薬の開発を目的として、微生物の培養液中にアロマトイックアミノ酸類のカルボキシル基を脱炭酸するドーパ脱炭酸酵素(以下D.D.Oと略記する)の作用を阻害する物質を系統的に探求し、幼体菌の培養液及び培養中にD.D.O阻害物質が各種存在することをみだし、これらを抽出単離し化合物を究むイソフラボン骨格を持つ3種の化合物である事を見出した。さらに化学的な詳細な研究から、これら化合物の一つは新規化合物である3',4',5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボンである事を明かにするとともに他の二つの化合物が4',5,7-トリヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン及び4',6,7,8-テトラヒドロキシイソフラボ

3

ン基でY=水素原子である場合の化合物が8-ヒドロキシグեսティン(以下では化合物(II)ともいう)である。

それ故、本発明の要旨とするところは、系状態に属する次の一般式、



(式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である)のイソフラボン化合物の生細胞を好意的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することを特徴とする。微生物による上記一般式(I)のイソフラボン化合物の製造法である。

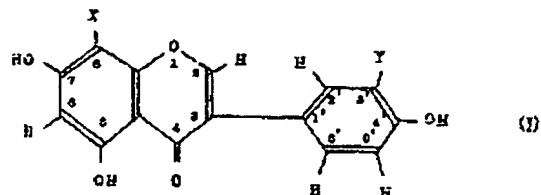
本発明以前においては、前述化合物(II)は天然物

4

特開 昭50-160483(2)

ンであることを同定した。またこれら3種の化合物を該生物の培養物から採取する方法を説明した。

上記の二つのイソフラボン化合物は次の一般式



(式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である)で表わされるが、一般式(I)においてX=メトキシ基及びY=ヒドロキシ基である場合の化合物が新規物質3',4',5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン(以下では化合物(II)ともいう)であり、X=メトキシ基及びY=水素原子である場合の化合物がプサイ・テクトリゲニン(以下では化合物(III)ともいう)であり、さらにX=ヒドロキ

5

としても化学合成物としても報告されておらず本発明者らが初めて発見した新規物質である。また化合物(II)は、ナクトリゲニンの構造異性体として、ウィルソン・ベーカー等(Wilson Baker et al)により1958年初めて合成されChemistry and Industry March 277, 1958, に報告されており、化合物(III)については1960年ブダペスト工科大学のエル・フアルカスとジェー・バラディ(L. Farkas and J. Várady)により合成されActa chimica Academiae Scientiarum Hungaricae 26, 225-230, 1960に報告されているが、いずれの化合物も該生物の培養物より採取したのは本発明者らが最初である。さらに本発明者らはこれら化合物(I), (II), (III)の各種の薬物性に対する阻害作用の研究から、D.D.O阻害性を有することの他、これら化合物がヒスタジン脱炭酸酵素(以下H.D.Oと略記する)阻害活性、カテコールオーメチル転位酵素(以下COMTと略記する)阻害活性及びエストロゲン活性を有することを見出した。これらの阻害作用は本発明者らにより

初めて明らかにされ、これ以前には知られていなかった。以上の血凝阻害活性を有する化合物(I)、(II)、(III)は、D.D.C及びO.O.M.T活性を阻害することから、バキンソン氏病のドーパでの治療における補供薬として、ノルアドレナリンの生合成を阻害することにより高血圧症の治療薬、H.D.O.活性を阻害することから、抗アレルギー、抗炎症、の治療薬として、またエストロゲン活性を有する事から避妊及び動物での生育増加、生育促進剤としての用途が考えられる。

本発明の方法で用いる糸状菌に属する一般式(II)の化合物の生産菌の一例としてはアスペルギルス・ニガー-NRRL 3122 (*Aspergillus niger* NRRL 3122)があり、このアスペルギルス・ニガー-NRRL 3122株は、米国農務省農薬研究局北部利用研究開発部(NRRL)に保存された公知の保存菌であつて本発明者らがNRRLより分譲を受けたものである。なお、このアスペルギルス・ニガー-NRRL-3122株は工業技術院微生物工学技術研究所に改工研発第2063号として寄託

アスペルギルス属に属する8-ハイドロキシゲニステイン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、8-ハイドロキシゲニステインの製造法が提供される。

本発明の方法を実施するにあつては、使用生産菌を微生物の通常公知の培養法で好氣的に培養して培養物中に目的化合物を生産せしめることができる。また本発明の目的化合物(I)、(II)、(III)を生産せしめるためにカビ、放線菌その他の微生物の培養に用いられる栄養源はすべて利用できる。例えば炭素源としてはグルコース、マルトース、デキストリン、糊粉、ラクトース、サツカロース、グリセリンなど、又窒素源としてはペプトン、肉エキス、酵母、酵母エキス、大豆粉、綿実粉、落花生粉、コーンスチープリカー、米ぬか、動植物性化合物などを利用できるが、特に化合物(I)、(II)、(III)の生産のためには、グルコース、酵母を炭素源とし、大豆粉を窒素源とした培地が、これら化合物の生産のため好ましい培地である。化合物(I)、

されてある(昭和56年6月28日特許審判申請)。

微生物は人工的に、又自然界においても発酵を起しやすいが本発明にいうアスペルギルス・ニガー-NRRL 3122はその発酵菌の余てを包括する。本発明に言う該菌はイソフラゲン化合物(I)、(II)、(III)を生産し、これらの菌及び発酵菌と明確に区別されないものはすべてこれを含む。

それ故、本発明の第一の実施態様によれば、アスペルギルス属に属する3,4,5,7-テトラハイドロキシ-8-メトキシイソフラゲン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、3,4,5,7-テトラハイドロキシ-8-メトキシイソフラゲンの製造法が提供される。

また、本発明の第二の実施態様によれば、アスペルギルス属に属するプサイ・テクトリゲニン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、プサイ・テクトリゲニンの製造法が提供される。

さらに、本発明の第三の実施態様によれば、ア

8

(II)、(III)を生産せしめるため必要とするならば、糞、酵母、金剛糖、重碳酸塩の量を加えることもできる。なお培養液中にあるいは培養液中に消泡を必要とする時はシリコン樹脂、大豆油、アデカノール等の消泡剤を使用できる。

化合物(I)、(II)、(III)の生産のための培養温度は30-30℃が好ましく、化合物(I)、(II)、(III)は好氣的に培養して得られるが、ペニシリン等の抗生物質の生産のために用いられる。和とう培養法、連続培養法など培養法がそのまま本発明のために用いられる。

化合物(I)、(II)、(III)の生産菌の一例であるアスペルギルス・ニガー-NRRL 3122を、グルコース1%、酪酪形デンプン2%、ソイビーンミール2%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%を含む生産培地に接種し37℃で6日間振とう培養した時培養液のpHは6.0程度になり、化合物(I)、(II)、(III)の生産は最高に達する。また化合物(I)、(II)、(III)の培養液中での生産温度は、前述した、培養での培養条件によつて異なる事は専門家にとつて公知

10

の事実である。したがって菌株の改良、培養条件の選定によつて単一の化合物のみを生産せしめる事、特定の化合物を合理的に生産せしめる事は専門家にとつて容易な事である。この発明はそれ等のすべての生産方法をも包括するものである。さらにアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 を上述の如く培養したとき、培養物中に金剛化合物オロボル並びにグアニン（偶れもインフラボンの一様）を生成していることが認められた！本出願人の同日出願に係る特願第49-号明細書参照：発明の名称「微生物によるオロボールの製造法」。化合物(I)、(II)、(III)の定性はD.D.Cの陽性反応を認定することによつて定めて可。D.D.C 陽性反応はアワベラ等の方法(J. Biol. Chem.; 235, 126, 1960)に従つて測定されるが詳細は下記のとおりである。

1-ドーパ  $1 \times 10^{-2}$  モル/l、ピリドキサルリン酸  $7.8 \times 10^{-2}$  モル/l、ドーパデカルボキシラーゼ（この条件下でOD278nm=0.2を得る酵素量、通常、蛋白質1mg/ml）0.05ml、リ

11

毎に基づいて、培養液中の液体部分に存在している、これら化合物はpH 2.0でノタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等に抽出される。一方、液体中の化合物(I)、(II)、(III)は水と混じる有機溶剤、例えば、ノタノール、エタノール、アセトン、等で抽出し、蒸発器留液によつて蒸留し、これをpH 8.0のアルカリ水に溶解し、不溶部分をのぞいたのち、知量溶液と同様に溶解液を酸性(pH 2.0)に調整後ブタノール、酢酸ブチル、酢酸エチル等に抽出し、培養液から化合物(I)、(II)、(III)を抽出した溶剤と混合して蒸気蒸餾する。

上記の蒸留物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、クロロフォルム：メタノール0：1の混合溶剤で蒸出するとD.D.C 活性を有する5つの分画に分けられる。すなわち、フラクション80~90にφ-ラクトリグニン〔化合物(II)〕、フラクション95~98にグアニン、フラクション55~75に新化合物(I)、フラクション70~80にオロボルが、最後のフラクション100~120に8-ヘイドロキシゲ

13

特開昭50-160483(4)

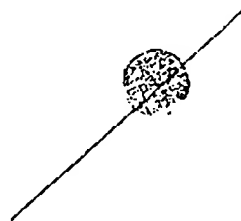
ン酸糖質（pH 8.9）0.03モル/l、インプロニアジド（IPRONIAZID） $1 \times 10^{-2}$  モル/lを合わせ、水で全容1.5mlとする。この混合液を37℃、25分間反応させ、精製するドーパミンを陽イオン交換樹脂アンバライト00-20（ロームアンドハース社製）アンモニウム型に吸着させ、水洗後、1N塩酸で洗出し、分取部279mlの吸収を測定した。その後より生成ドーパミン量を定量化し、貯蔵瓶を密封した。

次に化合物(I)、(II)、(III)の抽出、精製について記述する。これ等の化合物はアルカリ水、メタノール、エタノールアセトン等に極めて良く溶解し、ブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等にも溶解する。培養液中のこれら化合物は吸着でブタノール、酢酸ブチル等で抽出される。これら化合物は熱に安定であり、100℃5分間の加熱により、活性は低下しない。又60℃30分間の加熱で、pH 8.0、7.0、2.0で安定である。また化合物(I)、(II)、(III)はpH 2.0で酢酸ブチルに溶けるとから、これら化合物は昇降化合物である。この性

12

ニスタエイン〔化合物(III)〕が抽出分離される。これらのインフラボン誘導体のそれぞれを酢酸ブチル、メタノールに溶解し、セファデックス1B-30等により精製する。更にその活性部をシリカゲル（00-7-200-328メフシムマリンクロット）等のクロマトグラフィーを利用して、精製できる。化合物(I)、(II)、(III)は適切を蒸留、例えばベンゼンから精製される。

次に本発明によつて明らかにされた化合物(I)、(II)、(III)の理化学的性状、及び生物学的性状について記載する。



26

## A) 化合物(I), (II), (III)の理化学的性質

本発明によつて得られる化合物(I)は、黄褐色の、針状結晶であり、262℃で熔融分解する。元素分析の結果の一例はC: 60.63%, H: 3.86%, O: 35.51%で計算及び他の元素は含まれない。マクスベクトルグラフィーで $n_D^{20} = 1.316$ が与えられ、 $C_{16}H_{12}O_7$ の分子式を有する。なお、 $C_{16}H_{12}O_7$ の分子式を有する化合物の元素分析の理論値は、C: 60.76%, H: 3.88%, O: 35.41%である。又、化合物(II)はアルカリ水、メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、ジメチルスルホキシド等によく溶解するが、ベンゼン、クロロホルム、トルエン等には溶けにくい。

紫外線吸収スペクトル曲線では、メタノール溶液中で268m $\mu$  ( $\epsilon: 1.5 \times 10^4$ ), 295m $\mu$  ( $\epsilon: 1.5 \times 10^4$ )に吸収極大を有する。又、0.02%塩酸を含む酸性メタノール溶液では、268m $\mu$  ( $\epsilon: 1.5 \times 10^4$ ), 295m $\mu$  ( $\epsilon: 1.5 \times 10^4$ )に吸収極大を、0.02%塩酸水酸化ナトリウムを含む

15

炭酸のプロトンがあり、カップリングをしている。更に、 $\delta: 8.5$  ppmに芳香族性のプロトンが1個存在する。 $\delta: 3.8$  ppmにメトキシ基1個が存在する。又、オーバーハウザー効果の測定により、メトキシ基は8位に結合していることが示唆された。

ジメチル銅酸でメチル化を行なうと、4個のメチル基が導入され、テトラメチル体を得られる。このメチル体のメトキシ基に於いて、オーバーハウザー効果を測定することにより、置換基の位置が3', 4', 5, 7, 8位であることが決定された。又、稀水酢酸でアセチル化すると、アセチル基が4個導入され、テトラアセチル体を得ることができた。これにより、フェノール基の水酸基が4個存在することが決定された。更にこのアセチル体を濃クロロホルムに溶かし100メガヘルツの核磁気共鳴スペクトルを検討することにより、このアセチル体のB型のプロトンのカップリングの様式が明らかになった。これによりB型の置換様式は1, 3, 4置換様式であることが決定された。

15

メタノール溶液中では279m $\mu$

( $\epsilon: 1.5 \times 10^4$ ), 345m $\mu$  ( $\epsilon: 1.5 \times 10^4$ )に吸収極大を示す。

臭化カリウムとして紫外線吸収スペクトルを測定すると、波長340, 1680, 1530, 1450, 1380, 1270, 1240, 1180, 1135, 1065, 1035, 995, 910, 865, 830, 780, 735, 680cm $^{-1}$ に吸収が見られる。

定性反応は、縮化第二鉄反応、2,6-ジクロロキノロンクロロイミド反応、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン反応は陽性、エーデルマン反応、ニヒドリン反応は陰性である。シリカゲルの薄層クロマトグラフィーでは、クロロホルム: メタノール10:1でRf値0.38と、酢酸エチル: メタノール20:1でRf値0.70である。

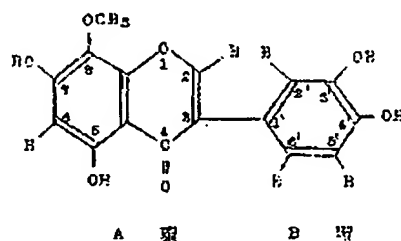
この化合物(I)の100メガヘルツの核磁気共鳴スペクトルに於いて、重アセトン中で $\delta: 13.0$ 付近に水素結合した水酸基の1個のプロトン、 $\delta: 8.2$ にイソフラゴン骨格のプロトンが1個、 $\delta: 7.1$  A,  $\delta: 6.9$  B ppmにそれぞれ1個と2個の芳香

16

なプロトンがあり、カップリングをしている。更に、 $\delta: 8.5$  ppmに芳香族性のプロトンが1個存在する。 $\delta: 3.8$  ppmにメトキシ基1個が存在する。又、オーバーハウザー効果の測定により、メトキシ基は8位に結合していることが示唆された。

紫外線吸収の極大が臭化アルミニウムの添加により14m $\mu$ 長波長にシフトすることにより、5位に水酸基が、加酸ソーダ添加により11m $\mu$ 長波長にシフトすることにより、7位にそれぞれ水酸基が存在することが決定された。

以上の結果により、化合物(I)の構造式を有するところの、3', 4', 5, 7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラゴンであると決定した。



化合物(I), (II)の構造は化合物(I)の構造を決定し

16

[illegible]

b) 化合物(I), (II), (III)の生物学的性状

a) 化合物(I), (II), (III)の毒性は85多シメチル  
スルホキサイド水溶液に溶解して、マウスの腹腔  
内に投与したときいずれの化合物も230mg/kg  
で毒性を示さなかつた。

b) 化合物(I), (II), (III)の各種酵素活性に対する  
阻害活性、(IV) D.D.Cの阻害活性は前述の方法で調  
定した時の化合物(I), (II), (III)の50%阻害濃度は  
それぞれ表2に示したとおりであつた。

表 2

化合物名	D.D.Cの50%阻害濃度
I	3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $8.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ )
II	61.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $1.7 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
III	2.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $9.2 \times 10^{-8} \text{ M}$ )

四 H D Cの阻害活性は下記に示す方法にしたが  
つて測定した。すなわちL-ヒステジン-2-<sup>14</sup>C  
( $1.0 \times 10^6 \text{ cpm}$ )を $5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、ピリドキ  
サルミン酸 $5.7 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、ヒステジンデカル

21

et al ; The Journal of Pharmacology and  
Experimental Therapeutics, 174 83-88,  
1970) このように測定した時の化合物(I), (II),  
(III)のCOMTの50%阻害活性は表4に示したと  
なりであつた。

表 4

化合物名	COMTの50%阻害濃度
I	6.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
II	8.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $2.9 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
III	1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $3.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ )

(五) エストラジオールに特異的に結合する子宮受  
容体に対する結合阻害活性測定法は、スタンレイの  
方法 (O.K. Stanley ; Journal Clinical Endo-  
crinology and Metabolism 28, 127, 1968) に  
準じて測定した。エストラジオールが結合するの  
を50%阻害する化合物(I), (II), (III)の濃度は表5  
に示したとおりであつた。

23

特開 昭50-160483 (I)

メキシラレーゼ (50mg/100ml) 0.1 ml、リン酸  
緩衝液 (PH 6.8) 0.057 Mの混合液に0.1 mlの  
検定する試料を入れ、脱イオン水で全容を2.0 ml  
とし、37℃で2時間反応させ、生成したヒスタ  
ミン-2-<sup>14</sup>Cをアンバーライト CG-80アンモ  
ニウム型に吸着させ、水洗後、1 ml脱アンモニウム水  
で、生成ヒスタミンを溶出させ、ブレイのシンテ  
レータを30%加え、その放射活性を液体シンテ  
レーションカウンターで測定し、生成ヒスタミン量  
を求める。このように測定したときの化合物(I),  
(II), (III)のH D Cの50%阻害活性は表3に示した。

表 3

化合物名	H D Cの50%阻害濃度
I	3.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $1.1 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
II	39.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $1.3 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
III	0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ )

(六) COMTの阻害活性はニコデジエビック等が報  
告した方法に準じて測定した。 (B. Nikodemovic

22

表 5

化合物名	50%阻害濃度
I	2.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $6.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
II	2.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $9.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ )
III	>20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $>7.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ )

本発明により新化合物(I)および化合物(II), (III)  
が糸状菌等の微生物によつて作られることが明ら  
かにされたので、この明細書に記された知見に基  
づいて、本明細書に記された方法を修飾した方法  
が容易に想到される。諸薬阻害物質の生合成阻害  
の阻害に際しない。他の糸状菌を用いてこれを生  
産することとは、本発明によつて容易なことである。  
本発明はそのすべての修飾方法を含括し、以下に  
示す実施例はその例示であつて、本発明は特許制  
に限定されるものではない。

#### 実施例 1

アスペルギルス・ニガー NRRL 3182株 (農工  
研発第2063号) をポテトデキストロース寒  
天斜面培地に34日間生育させ、そこから一白金

24



原料を馬鈴薯デンプン 8 g、グルコース 1 g、ソイビーンミール 2 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g を含む培地 250 cc を 600 cc 容積の瓶とフラスコに分注し、22°C で 20 分間脱脂したものに移殖し、27°C で毎分 330 回転の振とうで 5 日間培養した。DE は培養前 6.0、1 日後 5.6、2 日後 3.8、3 日後 3.2、4 日後 5.0、5 日後 4.2 であった。

上記 5 日間培養後の培養液は 1 cc 中 1 mg の濃度の化合物印を、化合物印を 0.5 mg、グニステイン 0.5 mg、D-ハイドロキシグニステイン 0.05 mg を含有していた。又培養液 10 ml より得られる固体は 5 ml のメタノールを加えインフラポン分離を有する化合物を抽出した。このメタノール液 1 cc 中には化合物印は 2 mg、化合物印は 0.5 mg、グニステインは 0.5 mg、化合物印は 0.05 mg 含まれていた。この培養液 10 ml を予濾して清澄な溶液 9 ml と固体固形物 1.8 ml が得られた。培養液は 2 ml-容量で DE 2.0 とし、4.5 ml の酢酸ブチルで 3 回抽出した。固体固形物

25

凝された。このシリカゲルのクロマトグラフィーにより、フラクション 200~300 に化合物印が 4.25~5.5 にグニステイン、5.5~7.5 に化合物印、7.5~8.0 にオロボル、8.00~12.0 に化合物印が、それぞれ層出された。それぞれの活性部分をあつめ減圧下に乾燥乾燥した後、それぞれを 5 cc のメタノールに溶解し、メタノールで懸濁させたセファデックス 1.2-20 を充填した 2 cc × 200 cm の管に懸せ、メタノールにより洗脱し D.D.O 阻害活性成分をあつめ乾燥乾燥した。この乾燥物をさらに精製する目的でそれぞれを 10 cc のメタノールに溶解し、それぞれにシリカゲル（マリンクロット社製シリシリツク 4 RCO-7、200~250 mesh マッシュ）10 g を加えて減圧乾燥乾燥し、これを、クロロホルム：メタノール（100：1）の溶媒系で上記と同じシリカゲル 60 g をゲル化させ 8.2 cc × 30 cm の管につめ、その上端に乾燥物をのせ上記の溶媒系でカラムクロマトグラフィーを行うと、それぞれ精製された 1 つのピークとなつた。この活性部分を集め減圧

26

抽出 50-160483 (8) 部は 5 ml のメタノールを加えよく材料抽出し出し 4.872 のメタノール抽出液が得られた。このメタノール抽出液を減圧乾燥乾燥した後、12 の水を加え、2 N-NaOH で pH 8.0 とにし溶解し不溶部を除く、D.D.O 阻害活性はそのほとんどが可溶部に存在する。この可溶部分を 2 N-HCl で pH 2.6 とにし、600 cc の酢酸ブチルで 3 回抽出し抽出した。この抽出液と前記培養液より D.D.O 阻害物質を抽出した酢酸ブチルを合せて、減圧乾燥乾燥して、黒褐色のタール物質 2.5 g を得た。このものの D.D.O に対する 50% 阻害は 37 mg/cc であった。このタール物質をメタノール 100 cc に溶解し 30 g のシリカゲル（マリンクロット社製シリシリツク、アシドコロ-2 スペシャル）を加えて減圧乾燥乾燥し、これをクロロホルム：メタノール（50：1）の溶媒系で上記と同じシリカゲル 60 g をゲル化させ 8.2 cc × 45 cm の管につめ、その上端に乾燥物をのせ、上記の溶媒系でカラムクロマトグラフィーを行い 20 cc の分画で層出すると D.D.O 阻害成分は 5 cc の分画に分

28

下で層出するとそれぞれの精製品が得られた。これらの精製品をメタノールベンゼンから再精製しそれぞれの精製品が得られた。これらの精製で化合物印が 2.5.8 mg、化合物印が 4.8 mg、グニステインが 80.5 mg、オロボルが 0.3 mg、化合物印が 4 mg のそれぞれの精製品が得られた。

## 実験例 2

ジャーによる培養は、実験例 1 のフラスコ培養の場合と同様な培養を作製し、アスペルギルス・ニガー NRRL 5122（農工研家第 2003 号）の斜面培養から一白金耳を接種し、二日間培養したものを接種とする。馬鈴薯デンプン 8 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g を含む培地 250 cc を 300 cc のジャーに仕込み、22°C、30 分間脱脂し、これに先きの酵母を 2 g 添加し、温度 27°C、毎分 200 回転攪拌、通気量毎分 10 l で 8 日間培養した。この培養液 2.5 ml をバスケット型濾心機で予濾し、2.5 ml の溶液を得た。実験例 1 と同様酢酸ブチル 4 ml で 3 回抽出しこれを減圧乾燥し、1.5 g のタール状物質を得た。

28

この抽出率は88%であつた。固体部分にはメタノール0.5を加え、U.D.C 阻害活性物質をメタノールに抽出せしめ、このメタノールを分離し、減圧蒸餾することにより、20%のタール状物質を得た。この活性抽出は70%であつた。浮遊及び固体から得たタール状物質をシリカゲル(CO-フラスペシャル-マリングロント)500gを充填したクロマト管で分離、精製し、D.D.O 阻害活性を有する5つの分離を得る。実施例1と同様にそれぞれをセファテックスLR-20、100gのクロマトグラフィーで精製し、さらにシリカゲル(マリングロント社製シリシリツク&R000-7200~325メツシニ)500gを充填したクロマト管をもちいクロマトグラフィーを行ない精製し、メタノールベンゼンから結晶化させた。この場合は20.8%の化合物(I)、7.8%の化合物(II)、11.5%のゲニステイン、0.2%のオロボール、5.2%の化合物(III)の結品を得た。

#### 実施例 8

シラによる培養は実施例1と同様にして培養

29

比率と同様に精製し以下の量のイソフラボン誘導体の結品を得た。即ち化合物(I)を180%、化合物(II)を10.2%、ゲニステインを100%、オロボールを80.8%、および化合物(III)を45.5%、各々の結品として得た。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は化合物(I)の純メタノール溶液(曲線a)、0.01%固定塩酸を含む90%メタノール溶液(曲線b)、及び0.01%固定水酸化ナトリウムを含む90%メタノール溶液(曲線c)中の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

第2図は第1図と同様な溶剤中での化合物(II)の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

第3図は第2図と全く同様な溶剤中での化合物(III)の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

第4図、第5図、第6図はそれぞれを炭化カリウム溶液中で測定した時の化合物(I)、II、IIIの紫外線吸収スペクトル曲線を示したものである。

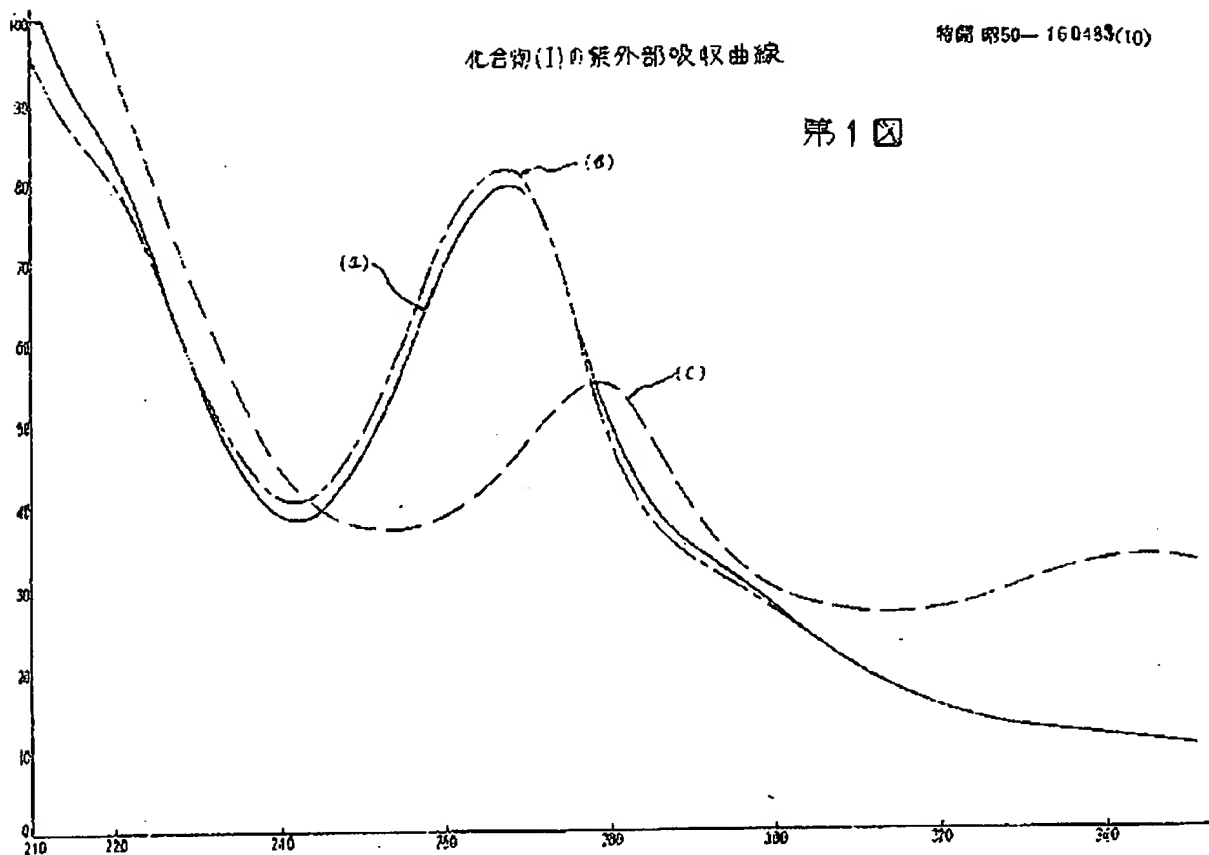
31

した培養を第1次培養とし、実施例8と同様にして培養した培養を第2次培養として、200g容のステンレススチール製タンクに実施例1と同様の培養を150g仕込み、シリコン樹脂を0.01%加え125℃、30分加熱し、これに第2次培養を52倍希し毎分200回転で撹拌し、27℃で5日間培養した。この培養液をフィルタープレスでろ過し220gの培養液と固体21gを得た。培養液は実施例1及び2と同様に乾燥でpH 2.0となし酢酸ブチルC04で5倍希釈液中に含まれているD.D.O 阻害物質を抽出した。又固体固形部分に含まれるD.D.O 阻害物質の抽出は60%のメタノールを加え、かく拌、抽出、ろ過し、メタノール抽出液83gを得た。このメタノール抽出液を濃縮、乾燥、乾留し、一酸化水酸化ナトリウムを加えつつ10%の水(pH 8.0)に溶解した。この溶液に酢酸を加え、pH 8.0となし、酢酸エチル6gで3回抽出した。この酢酸ブチル抽出液は、培養液より抽出した酢酸ブチルとあわせ減圧濃縮乾留し以後実施例1と同様の

30

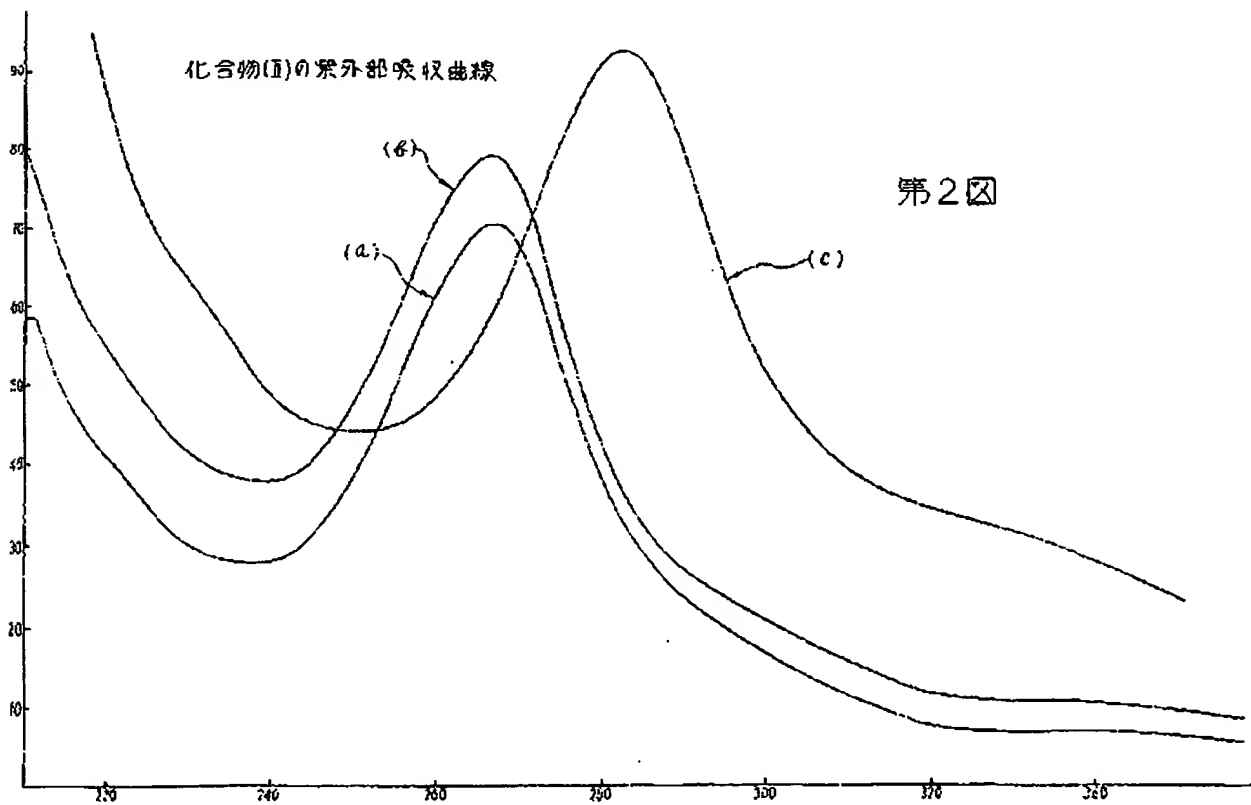
化合物(I)の紫外吸収曲線

第1図

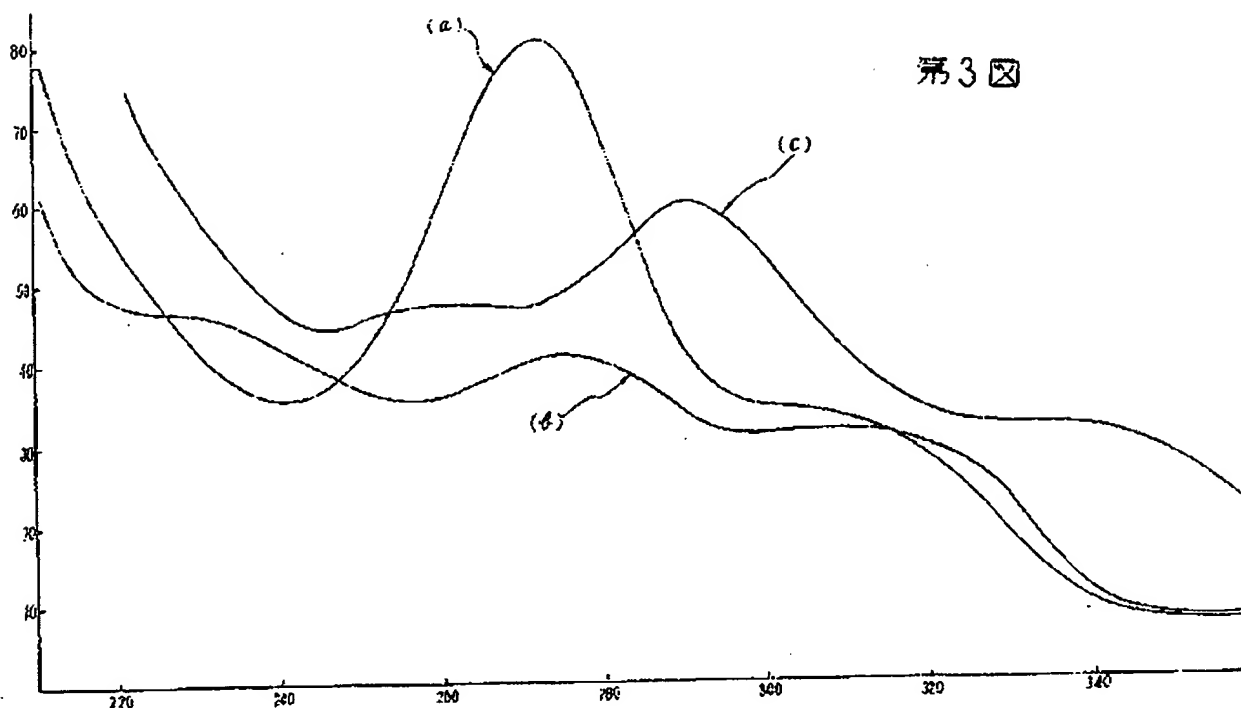


化合物(II)の紫外吸収曲線

第2図

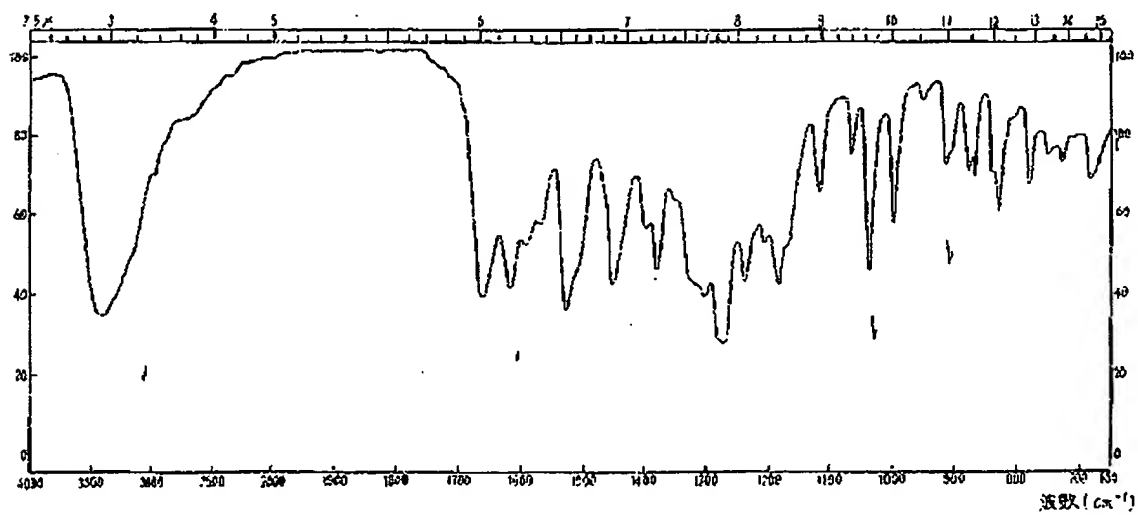


化合物(Ⅲ)の紫外吸収スペクトル曲線



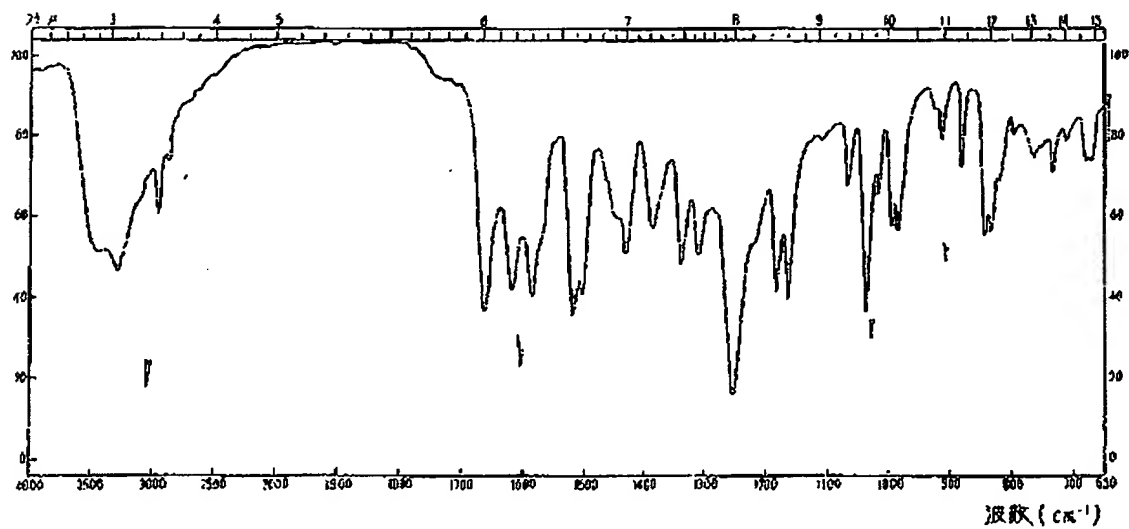
第4図

化合物(Ⅰ)の赤外吸収スペクトル曲線



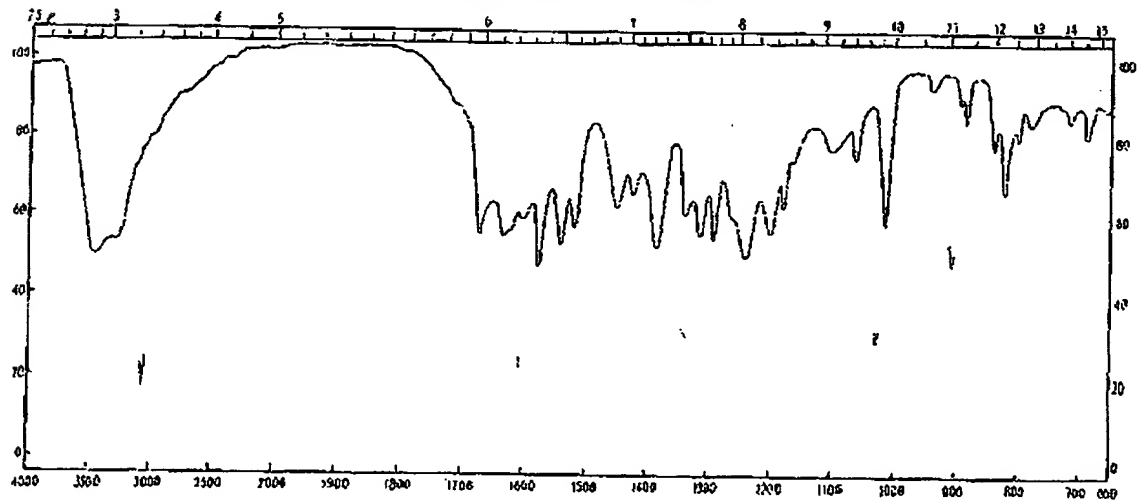
第5図

化合物(Ⅱ)の赤外吸収スペクトル曲線



第6図

化合物(Ⅲ)の赤外吸収スペクトル曲線



## 手続補正書 (自発)

昭和 49 年 10 月 3 日

特許庁長官 殿

## 6. 添附書類の目録

- (1) 明細書 1 通  
 (2) 図 面 1 通  
 (3) 委任状 1 通  
 (4) 新書調本 1 通  
 (5) 微生物受託番号通知書 1 通

## 7. 前記以外の発明者、代理人

## (1) 発明者

住所 東京都品川区東五反田5丁目1番11号  
 ニューフジマンション701-A

氏名 竹 内 昌 雄

住所 東京都世田谷区東玉川町2丁目12番地

氏名 戸 部 広 敏

## (2) 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号  
 三井物産屋内

氏名 朝 内 忠 夫

同所 八 木 田 茂

同所 浜 野 孝 雄

同所 森 田 哲 二

## 1. 事件の表示

昭和 49 年 特 許 願 第 691129 号

2. 発明の名称 生体活性を有するイソフラボン  
化合物の微生物による製造法

## 3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

住所 東京都品川区上大崎3丁目1番23号

氏名 財団法人微生物化学研究会

## 4. 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号、三井物産屋内

(2400) 氏名 金 丸 義 男

## 3. 補正の対象

明細書の発明の詳述及説明の欄

## 4. 補正の内容

- (1) 明細書第3頁第6行の「パー・ペンソン」を「パーキンソン」と訂正する。  
 (2) 同第4頁第4行の「Wilson」を「Wilson」と訂正する。  
 (3) 同第7頁第8行の「パーキンソン」を「パーキンソン」と訂正する。  
 (4) 同第10頁第9行の「。」を削除する。  
 (5) 同第11頁第10行の「ター」の次に「69/18」を加入する。  
 (6) 同第11頁第4行(下から)の「リード・バ」の前に「終濃度で」を加入し、「セル/2」を「M」と訂正する。  
 (7) 同第11頁第3行(下から)の「セル/2」を「M」と訂正する。  
 (8) 同第12頁第1行の「セル/2」を「M」、  
 「イソブ」を「イブ」とそれぞれ訂正する。  
 (9) 同第12頁第3～5行の「セル/2」を「M」を

替わせ、「」を削除し「Mの化合物系に限定する試料の、」を加え」を加入する。

- (10) 同第12頁第5行の「アンバライト」を「アンバライト」と訂正する。  
 (11) 同第12頁第12行の「エタノール」の次に「。」を加入する。  
 (12) 同第12頁第13行の「エチール」を「エチル」と訂正する。  
 (13) 同第12頁第14行の「ブテール」を「ブテル」、  
 「エテール」を「エテ」とそれぞれ訂正する。  
 (14) 同第14頁第5行の「ロクター」を「マリンクロフト社製レリフクA R C C-7」と補正する。  
 (15) 同第16頁第3行～第6行の「マリンクロフト」を削除する。  
 (16) 同第18頁第6行の「マススペクトルグラフ」を「マススペクトロメトリー」と補正する。  
 (17) 同第18頁第3行の「340」を「3400」と訂正する。  
 (18) 同第20頁第10行の「分子式」を「分子重及び分子式」、「300」を「360, C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>」。

「284」を「284, C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>」と修正する。

② 同第20頁第1の第8行、第9行、第10行の各「nn」をいずれも「nm」と訂正する。

③ 同第23頁第2行の「ExDeolmental」を「Experimental」と訂正する。

④ 同第24頁第7行および第9行の「ブテール」を「ブナル」と訂正する。

⑤ 同第26頁第7行の「シリシリツク。アレドCC-7」を「シリツクABCRC-7」と修正する。

⑥ 同第26頁第10行の「外質」を「物質」、「5ヶ」を「5個」と訂正する。

⑦ 同第27頁第8行（下から）の「シリシリツク」を「シリツク」と訂正する。

⑧ 同第28頁第2行の「メチノール」の次に「・」を加入する。

⑨ 同第28頁第9行（下から）の「メ、」の次に「グルコースノ、ソイビーンミール2%」を加入する。

⑩ 同第28頁第6行（下から）の「き」を削除する。

⑪ 同第28頁第3行（下から）の「し、」の次に「固体洗滌液を合せて」を加入する。

⑫ 同第29頁第4行～第7行の「CC-7をスペシャルーマリノクロツト」を「マリノクロツトはシリツクABCRC-7。スペシャル」と修正する。

⑬ 同第29頁第9行（下から）の「シリシリツク」を「シリツク」と訂正し、「-7」の次に「・」を加入する。

⑭ 同第29頁第4行（下から）の「メチノール」の次に「・」を加入する。